بررسی فیتوشیمیایی و تشخیص کورکومینوییدها در عصاره زردچوبه(Curcuma longa L.) به روش سوکسله و مقایسه محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی در روش های مختلف عصاره گیری

سمانه نوری[۱]، علیرضا کیاست[۱]، مریم کلاهی[۲*]، رویا میرزاجانی[۱]، سیدمنصور سیدنژاد[۲]

۱) گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۷ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۲**

چکیده

مقدمه: زردچوبه با نام علمی .Curcuma longa L متعلق به خانواده زنجبیل می باشد. نوع روش استخراج بر درصد و نوع ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گیاه موثر است. هدف از این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی عصاره ســـوکسله زردچوبه با استفاده از روش های دستگاهی مختلف و اندازه گیری محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی در روش های مختلف عصاره گیری است.

مواد و روش ها: آزمون های فیتوشیمیایی به منظور تعیین متابولیت های ثانویه بر روی عصاره سوکسله اتانولی این گیاه انجام شد و روش های آنالیز دستگاهی مخـــتلف به منظور تاییدی بر وجود کورکومینوئیدها بر روی این عصاره صورت گرفت. محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی عصاره ها با روش های مختلف عصاره گیری(ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله) با استفاده از استاندارد کوئرستین سنجیده شد.

یافته های پژوهش: نتایج به دست آمده از بررسی فیتوشیمیایی، حضور ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و گلیکوزیدی و عدم حضور ترکیبات تانني و ساپونینی در عصاره سوکسله اتانولی را تایید می کند. یافته های IR، UV، GC و GC/Mass بیانگر وجود کورکومینوئیدها در عصاره زردچوبه به روش سوکسله می باشد. نتایج آزمون های آماری نشان داد که بیشترین محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی مربوط به عصاره استخراج شده با دو حلال هگزان و اتانول است.

بحث و نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که روش سوکسله علی رغم نیازمند بودن به دمای بالا و استفاده نمودن از حلال داغ، ساختار کورکومینوئیدها را در این روش عصاره گیری حفظ کرده است و این روش عصاره گیری می تواند یک روش مناسب جهت استخراج کورکومین از گیاه زردچوبه باشد. هم چنین روش مناسب جهت استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و فلاونولی، روش استخراج با دو حلال هگزان و اتانول می باشد.

واژه های کلیدی: استخراج، کورکومینوئید، فلاونوئید، فلاونول، .Curcuma longa L

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تامین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری ها برخوردار بوده و هستند. در پیکر گیاهان مواد خاصی به نام مواد موثره یا مواد فعال ساخته و ذخیره می شود که این مواد تاثیر فیزیولوژیکی بر پیکر موجود زنده بر جا می گذارند که این مواد برای درمان برخی بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. این مواد طی فرآیندهای ویژه و پیچیده بیوشیمیایی، به مقدار بسیار کم ساخته می شوند و به متابولیت های ثانویه(Secondary metabolite) نیز معروفند. تقسیم بندی مواد موثره(دارویی) گیاهان که امروزه مورد تایید است، به صورت چهار گروه اصلی آلکالوییدها(Alkaloid)، گلیکوزیدها(Glycoside)، روغن های فرار(Volatile oil) و سایر مواد موثره است. منظور از سایر مواد موثره، ترکیباتی چون مواد تلخ(Bitter materials)، فلاون ها(Flavones)، فلاونوییدها(Flavonoids)، موسیلاژها(Mucilage) (و کربوهیدارت های خاص مشابه آن)، ویتامین ها (Vitamins)، تانن ها(Tannins)، سیلیسیک اسید (Silicic acid)(و اسیدهای خاص مشابه آن) و بالاخره ترکیبات دیگر امثال آن است که به دلیل ناهماهنگی و گستردگی ساختمان های شیمیایی شان، در سه گروه اصلی جای نمی گیرند(۱).

فنل ها متابولیت های ثانویه گیاهی هستند که شامل گروه بزرگی از اجزای فعال زیستی(بیش از ۸۰۰۰ ترکیب) از مولکول های فنل ساده تا ساختارهای پلیمری با جرم مولکولی بالای ۳۰۰۰۰ دالتون می باشند. در طبقه بندی مدرن، بر اساس تعداد زیر واحد فنلی، شامل دو گروه فنلی(فنل های ساده و پلی فنل ها) می باشد. گروهی که در برگیرنده فنل های ساده هستند، معمولاً اسیدهای فنلی یا فنل هایی با گروه کربوکسیل می باشند. پلی فنل ها نیز حداقل دارای دو حلقه فنلی هستند که فلاونوئیدها به این گروه تعلق دارند. در واقع این ترکیبات از به اشتراک گذاری یک ساختار مشترک متشکل از دو حلقه آروماتیک که با هم توسط سه اتم کربن متصل شده اند و هتروسیکل اکسیژنی را ایجاد می کنند، تشکیل می گردند. فلاونوئیدها را بر اساس نوع هتروسیکل مربوطه می توان به ۶ زیر گروه تقسیم کرد: فلاونول، فلاون، ایزوفلاون، فلاونون، آنتوسیانیدین و فلاوانول(کتچین و پرو آنتوسیانیدین). بیش از ۴۰۰۰ فلاونوئید در گونه های ابتدایی و پیشرفته گیاهی شناسایی شدند(۲،۳). بیشترین اثرات سلامتی بخش فلاونوئیدها را می توان به توانایی های آنتی اکسیدانی و کیلیت شدن آن ها نسبت داد(۴).

به دلیل اثرات مثبت مواد فیتوشیمیایی بر سلامت بشر و کاربردهای گسترده در صنعت و زندگی انسان، همواره این ترکیبات کانون توجهات بوده است. تحقیقات بر روی عصاره های گیاهان حاوی فنل، به دلیل افزایش تقاضا در سراسر جهان بر روی ترکیبات فنلی و کاربرد آن ها در صنایع غذایی در حال رشد می باشد.

اثرات سودمند موجود در ترکیبات فنلی اغلب به خصوصیات آنتی اکسیدانی آن ها بر می گردد. نتایج مطالعات نشان می دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از سبزیجات و میوه جات به محتوای کل ترکیبات فنلی آن ها بستگی دارد. در فرآیند استخراج این ترکیبات عواملی چون نوع حلال، دما و زمان استخراج بسیار مهم می باشد(۵). زردچوبه (Turmeric) با نام علمی Curcuma longa L. متعلق به خانواده زنجبیل(Zingiberaceae) می باشد. قسمت مورد استفاده این گیاه ریزوم های آن است. رنگ زرد آن که مشخصه ریزوم زردچوبه می باشد به حضور ۳ تا ۵ درصدی کورکومینوییدهای موجود در آن مربوط می گردد که شامل کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین می باشد(۶). ریزوم زردچوبه غنی از اجزای گیاهی همانند آلکالوئیدها، ساپونین ها، فلاونوئیدها، ترپن ها و استروئیدهاست که این مواد دارویی به طور گسترده در درمان بیماری های مختلف استفاده می شود. آنتی اکسیدان های طبیعی شامل ۴ دسته پلی فنل های فلاونوئیدی، پلی فنل های غیر فلاونوئیدی، اسیدهای فنلی یا دی ترپن های فنلی و ترکیبات آلی گوگرددار هستند که کورکومین در دسته پلی فنل های غیر فلاونوئیدی جای می گیرد(۷). این

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

ماده که از ریزوم زردچوبه حاصل می شود، خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد(۸). روش های مختلفی جهت شناخت و تشخیص ساختمان شیمیایی مولکولی مواد وجود دارد که بهترین روش جهت تعیین درجه خلوص نمونه مورد آزمایش، روش کروماتوگرافی می باشد. از روش های کروماتوگرافی می توان به کروماتوگرافی لایه نازک(TLC)، کروماتوگرافی گازی(GC) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC) اشاره نمود. در روش کروماتوگرافی لایه نازک، ماده خام مورد نظر به منظور جداسازی مواد متشکله آن، روی صفحه لکه گذاری می شود و سپس درون تانک کروماتوگرافی محتوی حلال آلی(فاز متحرک) قرار داده می شود تا حلال مسیر خود را روی صفحه طی کند. سپس صفحه TLC را از تانک خارج نموده و به وسیله اشعه ماوراء بنفش با طول موج های مختلف (۳۶۵ nm و ۲۵۴ nm) ، معرف های شیمیایی لکه ها و یا خطوط مشخص، جداسازی و تشخیص داده می شوند. در روش کروماتوگرافی گازی، نمونه مورد آزمایش پس از تزریق، وارد فاز متحرک شده و آن را به ستون(فاز ساکن) وارد می‌کند. سپس ماده مورد تفکیک در اثر حرارت بین گاز و فاز ساکن پخش شده که ممکن است حل یا جذب گردد که با در نظر گرفتن زمان لازم برای خارج کردن جسم از ستون(زمان بازداری: Retention Time) و حجم گاز مورد نیاز برای خارج کردن جسم از ستون(حجم بازداری: Retention Volume)، به وسیله آشکارساز، ارزشیابی و مشخص می گردد. تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC) نیز، هم برای آنالیز کیفی (تشخیص و شناسایی نوع ترکیبات) و هم آنالیز کمی (تعیین مقدار ماده) مورد استفاده قرار می گیرد. زمان بازداری برای هر ماده در یک سیستم و شرایط خاص آزمایشگاهی ثابت و مشخص می باشد. لذا از زمان بازداری جهت تعیین نوع آنالیت استفاده می شود(۹).

طبق بررسی های صورت گرفته بر روی عصاره های مختلف اتانولی گیاه زردچوبه(سوکسله، اولتراسونیک و ماسراسیون)، مشخص گردید که عصاره سوکسله اتانولی این گیاه بیشترین راندمان وزنی را دارا است(۱۰). اما از آن جا که این روش عصاره گیری نیازمند دمای بالا و حلال داغ می باشد، ممکن است ساختار کورکومین تخریب گردد. بدین منظور در این پروژه سعی گردید برای اطمینان از حفظ شدن ساختار کورکومین، آنالیزهای UV، IR، GC و کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی بر روی عصاره سوکسله اتانولی این گیاه صورت گیرد تا محدوده جذبی، گروه های عاملی و پیک یون مولکولی کورکومین با استفاده از این آنالیزها شناسایی گردد. هم چنین وجود متابولیت های ثانویه به ویژه ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از آزمون های فیتوشیمیایی بر روی عصاره سوکسله(به دلیل اکتساب بیشترین راندمان وزنی) این گیاه مورد بررسی قرار گیرد و در انتها محتوای فلاونوئیدی و فلاونولی به منظور مقایسه میزان آن ها در روش های مختلف عصاره گیری سنجیده شود. با توجه به بررسی های انجام شده تاکنون مقایسه روش های عصاره گیری و تاثیر آن بر متابولیت های مختلف موجود در زردچوبه صورت نگرفته است. لذا بررسی دقیق متابولیت های مختلف و میزان کمی کورکومین در این مطالعه می تواند در صنعت داروسازی به کار گرفته شود.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده: کوئرستین(Sigma/آمریکا)، اتانول HPLC (Merck/آلمان)، کورکومین(Acros/ بلژیک).

آماده سازی نمونه: پس از تهیه ریزوم زردچوبه هندی از بازار اهواز و شناسایی آن توسط بخش گیاه شناسی گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، نمونه با استفاده از آسیاب پودر گردید.

عصاره گیری از گیاه: عصاره های اتانولی گیاه زردچوبه به سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله تهیه گردید.

عصاره گیری به روش ماسراسیون: در ابتدا ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه وزن گردید. سپس ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد به عنوان حلال افزوده شد. پودر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در تماس با حلال بر روی هم زن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از مدت تعیین شده، آن را صاف کرده و به منظور تغلیظ کردن آن از دستگاه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

روتاری استفاده گردید. سپس عصاره به دست آمده به منظور خشک شدن درون آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد(۱۱).

عصاره گیری به روش اولتراسونیک: به ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد به عنوان حلال به آن افزوده شد و در معرض امواج صوتی با فرکانس ۴۰ KHz به مدت ۶ دقیقه درون حمام اولتراسونیک قرار گرفت. عصاره به دست آمده صاف گردیده و توسط روتاری تحت خلا، حلال آن تبخیر گردید. سپس درون آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ روز نگهداری شد(۱۲،۶).

عصاره گیری به روش سوکسله: ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه درون انگشتانه دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد درون بالن ریخته و سپس بالن درون حمام روغن و تحت شرایط رفلاکس قرار داده شد و عمل عصاره گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. بعد از اتمام این فرآیند، عصاره به دست آمده روتاری شد و در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت(۱۱).

استخراج توسط دو حلال هگزان و اتانول: ۱۱ گرم از پودر زرد چوبه وزن و به آن ۱۲۰ mL هگزان افزوده شد. پودر گیاه به مدت ۲۴ ساعت در تماس با حلال بر روی هم زن مغناطیسی قرار گرفت. سپس، آن را صاف کرده و پودر زردچوبه صاف شده به مدت یک ساعت جهت خشک شدن کامل، درون آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به ۱۰ گرم از پودر حاصله ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد افزوده شد. پودر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در تماس با حلال بر روی هم زن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از مدت تعیین شده، صاف و به منظور تغلیظ کردن آن از دستگاه روتاری استفاده گردید(۱۳). سپس عصاره به دست آمده به منظور خشک شدن درون آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

آزمون های فیتوشیمیایی(Phytochemical tests) صورت گرفته بر روی عصاره سوکسله اتانولی گیاه زردچوبه: جهت بررسی مقدماتی متابولیت های ثانویه، آزمون های فیتوشیمیایی جهت شناسایی مواد موثره بر روی عصاره سوکسله زردچوبه صورت گرفت. پنج دسته مهم ترکیبات گیاهی شامل آلکالوییدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، تانن ها و ساپونین ها مورد بررسی قرار گرفت(۱۵،۱۴).

آماده سازی عصاره محلول: ۲۵ mg از عصاره را در ۵۰ mL اتانول حل نموده و سپس آزمون های فیتوشیمیایی بر روی عصاره محلول انجام شد. وجود و عدم وجود متابولیت های ثانویه عصاره سوکسله در حضور محلول شاهد مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت که این آزمون‌ها در جدول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

بررسی عصاره سوکسله زردچوبه با استفاده از طیف سنجی IR و مقایسه نمونه استاندارد: به منظور مقایسه ترکیبات موجود در نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله، مقداری از هر دو نمونه در کلروفرم حل گشت و طیف IR مایع از آن ها گرفته شد.

بررسی نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله زردچوبه با استفاده از آنالیز UV: به منظور مقایسه ترکیبات موجود در نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله، غلظت $10\ \mu g\ mL^{-1}$ از هر دو نمونه در اتانول ساخته شد. بدین صورت که ۱۰ میلی گرم از هر دو نمونه وزن گردید و سپس با اتانول به حجم ۱۰ mL رسانیده شد. غلظت تهیه شده در این مرحله، غلظت $1000\ \mu g\ mL^{-1}$ می باشد. به منظور تهیه غلظت $10\ \mu g\ mL^{-1}$ از این نمونه، رقت سازی صورت گرفت. ۱۰۰ µL از هر کدام از نمونه ها را برداشته و درون بالن حجمی با اتانول به حجم ۱۰ mL رسانیده شد.

شناسایی کورکومینوئیدها در نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله زردچوبه با روش کروماتوگرافی گازی: بدین منظور نمونه های با غلظت $5\ \mu g\ mL^{-1}$ از نمونه استاندارد کورکومین(Acros/ بلژیک) و عصاره سوکسله زردچوبه، در حلال اتانول (Merck/آلمان) با درجه HPLC تهیه شد. جداسازی کورکومین در نمونه های حقیقی مورد آزمایش با دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent مجهز به آشکارساز یونش شعله ای(FID: Flam Ionization Detector) و ستون موئینه از نوع BP21-FFAP (ضخامت فیلم فاز ثابت µm ۱-۰/۱، طول

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

m ۲۵ و محدوده‌ی دمایی ۳۶۰-۳۵ درجه سانتی گراد) انجام شد. از هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۲۹ mL/min استفاده شد. بعد از تزریق نمونه ها، دمای ستون به مدت ۴ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی گراد باقی ماند و پس از آن با سرعت ۴ درجه سانتی گراد بر دقیقه به ۲۶۰ درجه سانتی گراد رسید و در این دما به مدت ۵ دقیقه برای تکمیل جداسازی ثابت ماند. دمای محل تزریق و آشکارساز به ترتیب در ۲۸۰ درجه سانتی گراد و ۳۰۰ تنظیم شد. حجم تزریق نیز ۱۰ µL انتخاب گردید(۱۶).

تعیین کورکومین موجود در عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی: به منظور تعیین کورکومین در عصاره اتانولی سوکسله زردچوبه، ۱ µL از عصاره حاصله، به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی تزریق گردید. ابتدا آون به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. بعد از این مرحله دما با سرعت ۵ درجه سانتی گراد بر دقیقه تا دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت، دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد و طیف مشخص گردید(۱۶).

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی: محتوای فلاونوییدی کل با استفاده از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید ژیشن(Zhishen) و همکاران با اعمال تغییراتی انجام گرفت. محلول هایی با غلظت ۵۰ µg mL^{-1} در اتانول از عصاره های مختلف ساخته شد. به ۱ mL از عصاره های با غلظت ۵۰ µg mL^{-1}، ۴ mL آب دیونیزه و ۰/۳ mL محلول ۵ درصد NaNO2 افزوده شد. و بعد از گذشت ۵ دقیقه ۰/۳ mL محلول ۱۰ درصد AlCl3 به آن اضافه شد و بعد از گذشت ۶ دقیقه ۲ mL محلول سود ۱ mol L^{-1} به آن افزوده و سپس با آب دیونیزه به حجم ۱۰ mL رسانده شد. محلول ها به هم زده شد و سپس جذب آن در ۵۱۰ nm ثبت شد(۱۷). سپس به کمک منحنی استاندارد کوئرستین(Sigma/آمریکا)، محتوای فلاونوئیدی عصاره ها بر حسب µg mL^{-1} گزارش شد.

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فلاونولی: محتوای فلاونولی کل عصاره ها با استفاده از روش کوماران (Kumaran) و همکارش با اعمال تغییراتی انجام گرفت. محلول هایی با غلظت ۵۰ µg mL^{-1} در اتانول از عصاره های مختلف ساخته شد. به ۲ mL از عصاره های با غلظت ۵۰ µg mL^{-1}، ۲ mL محلول ۲ درصد $AlCl_3$ در اتانول و ۳ mL محلول CH_3COONa با غلظت ۵۰ g/L در آب افزوده شد. محلول ها به هم زده شد. سپس بعد از گذشت ۱۵۰ دقیقه جذب آن در ۴۴۰ nm ثبت شد(۱۸). سپس به کمک منحنی استاندارد کوئرستین(Sigma/آمریکا)، محتوای فلاونولی عصاره ها برحسب µg mL^{-1} گزارش شد.

آنالیز آماری داده ها: به منظور آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. تمام داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار نشان داده شدند. سطح معنی داری تست های آماری در مورد همه تست ها $P<0.05$ در نظر گرفته شد. برای بررسی اختلاف آماری بین میانگین پارامترهای مختلف در گروه های مورد آزمایش از آزمون های دانکن(Duncan) و شفه (Scheffe) استفاده شد. نمودارهای مقایسه میانگین با نرم افزار(۲۰۱۰) Excel رسم شدند.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از آزمون های فیتوشیمیایی صورت گرفته بر روی عصاره سوکسله اتانولی گیاه زردچوبه: نتایج به دست آمده از بررسی های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و گلیکوزیدی را تایید می‌کند. این در حالی است که ترکیبات تانی و ساپونینی در عصاره سوکسله اتانولی گیاه(Curcuma longa) یافت نشد(جدول شماره ۱ و ۲).

نتایج حاصل از مقایسه نمونه استاندارد و عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه با استفاده از طیف سنجی IR: بررسی صورت گرفته بر روی طیف FT-IR نمونه استاندارد کورکومین(شکل شماره ۱-A)، وجود گروه های C=O در ۱۷۳۱ Cm^{-1} و جذب ضعیف

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

C=C در نزدیکی Cm^{-1} ۱۶۵۰ را تایید می کند. پیک مربوط به C-O در Cm^{-1} ۱۱۲۸ و Cm^{-1} ۱۲۶۷/۵۴ مشاهده می شود. پیک پهن ایجاد شده در Cm^{-1} ۳۴۰۵ وجود گروه OH در ترکیب را تایید می نماید. هم چنین جذب متوسط در عدد موجی Cm^{-1} ۱۴۵۸/۱ بیانگر وجود حلقه آروماتیک می باشد. قابل انطباق بودن طیف IR نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله زردچوبه(شکل شماره ۱-B)، دلیلی بر تایید وجود کورکومین در عصاره به دست آمده می باشد.

نتایج حاصل از مقایسه نمونه استاندارد و عصاره سوکسله زردچوبه با استفاده از آنالیز UV: مطالعات نشان می دهد که λ_{max} محتوای کورکومینوئیدی نزدیک به طول موج nm ۴۲۰ می باشد. بررسی λ_{max} کورکومین در طول موج nm ۴۲۴ نشان می دهد که نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه هر دو در این طول موج دارای جذب ماکزیمم هستند(شکل شماره ۲).

نتایج حاصل از شناسایی کورکومینوئیدها در نمونه استاندارد کورکومین و عصاره سوکسله زردچوبه با روش کروماتوگرافی گازی: به منظور تایید دیگری بر وجود کورکومین در گیاه زردچوبه و استخراج مناسب آن با روش عصاره گیری سوکسله که بیشترین راندمان وزنی را نشان داد، از نمونه استاندارد و عصاره سوکسله آنالیز GC گرفته شد(شکل شماره ۳). همان طور که مشاهده می شود با مقایسه کروماتوگرام های GC می توان به تایید حضور کورکومین در عصاره اتانولی سوکسله زردچوبه واقف شد.

نتایج حاصل از تعیین کورکومین موجود در عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی: طبق شکل شماره ۴ وجود کورکومین با جرم مولی g/mol ۳۶۸/۳ در زمان بازداری ۲۶/۱۶۳ دقیقه در این عصاره مورد تایید می باشد.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدارکل ترکیبات فلاونوئیدی: یافته های حاصل از بررسی محتوای ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از استاندارد کوئرستین نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی به دست آمده از روش استخراج با دو حلال هگزان و اتانول می باشد. این در حالی است که محتوای فلاونوئیدی به دست آمده از روش ماسراسیون با محتوای فلاونوئیدی به دست آمده از روش استخراج با دو حلال هگزان و اتانول، اولتراسونیک و سوکسله اختلاف معنی داری نداشت. هم چنین، محتوای فلاونوئیدی به دست آمده از روش اولتراسونیک و سوکسله نیز تقریباً یکسان بوده از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند($P<0.05$)(نمودار شماره ۱).

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فلاونولی: یافته های حاصل از بررسی محتوای ترکیبات فلاونولی با استفاده از استاندارد کوئرستین نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فلاونولی، به دست آمده از روش استخراج با دو حلال هگزان و اتانول می باشد. این در حالی است که محتوای فلاونولی به دست آمده از روش ماسراسیون با محتوای فلاونولی به دست آمده از روش اولتراسونیک از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشت. هم چنین کمترین مقدار محتوای فلاونولی مربوط به عصاره‌گیری به روش سوکسله بود($P<0.05$)(نمودار شماره ۲).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

جدول شماره ۱. بررسی فیتوشیمیایی انجام شده بر روی عصاره سوکسله گیاه زردچوبه

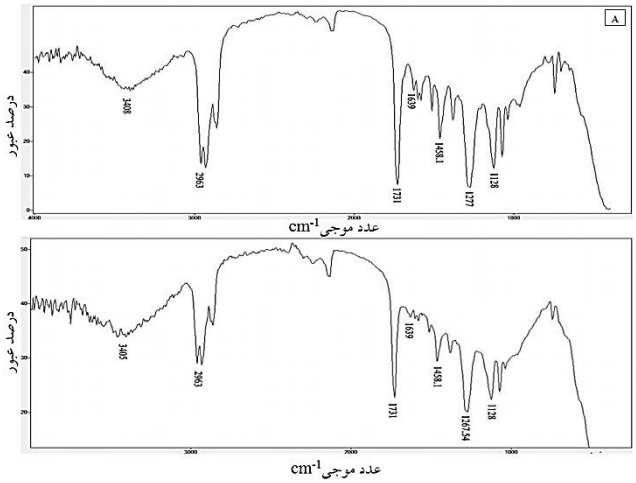
ماده موثره	ساپونین	تانن	فلاونوئید	گلیکوزید	آلکالوئید
آزمون انجام شده	آزمون کف کنندگی	آزمون فریک کلراید	آزمون شینودا کاهش روی کلرید معرف بازی	محلول فهلینگ	آزمون مایر آزمون دراژندروف آزمون واگنر آزمون هاگر
نحوه تشخیص	تولید کف	رنگ سبز آبی	رنگ صورتی رنگ قرمز رنگ زرد یا قرمز	رسوب قرمز آجری	رسوب کرم رسوب قرمز قهوه ای رسوب قرمز قهوه ای رسوب زرد رنگ

جدول شماره ۲. بررسی فیتوشیمیایی انجام شده بر روی عصاره سوکسله اتانولی گیاه زردچوبه به روایت تصویر. این آزمون در حضور محلول شاهد(محلولی حاوی تمامی واکنشگرها به غیر از نمونه آنالیت که عصاره می باشد) صورت گرفته است که تغییر رنگ عصاره در حضور محلول شاهد با استفاده از جدول شماره ۱ مورد بررسی قرار گرفت.

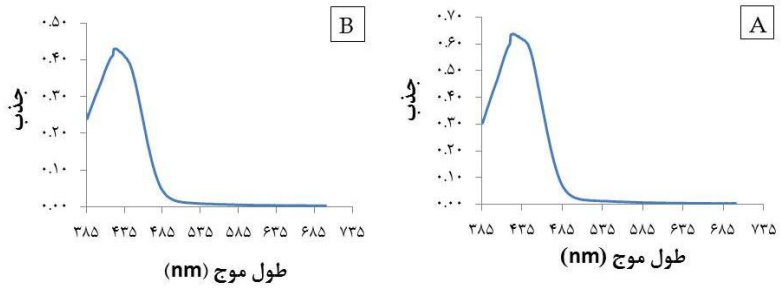
نوع آزمون		محلول عصاره	محلول شاهد
آلکالـــــــوئید:	آزمون مایر آزمون دراژندوف آزمون واگنر آزمون هاگر		
گلیـــکوزید	محلول فهلینگ		
فلاونوئـــــــید	آزمون شینودا آزمون کاهش روی کلرید آزمون معرف بازی		
تانن	آزمون فریک کلراید		
ساپونین	آزمون کف کنندگی		

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

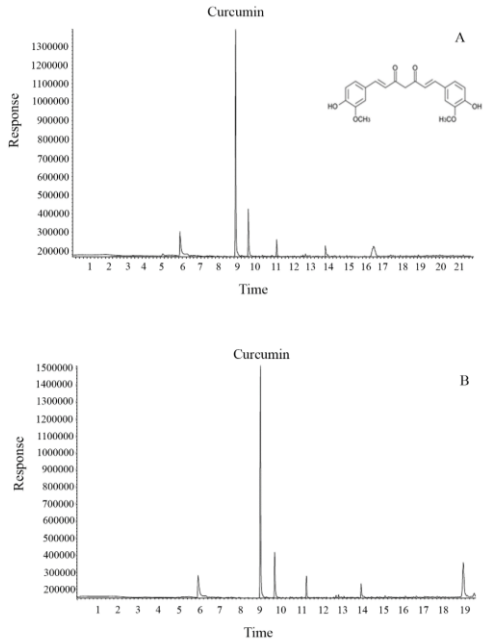
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]



شکل شماره ۱. طیف IR مایع: A. نمونه استاندارد کورکومین و B. عصاره سوکسله زردچوبه



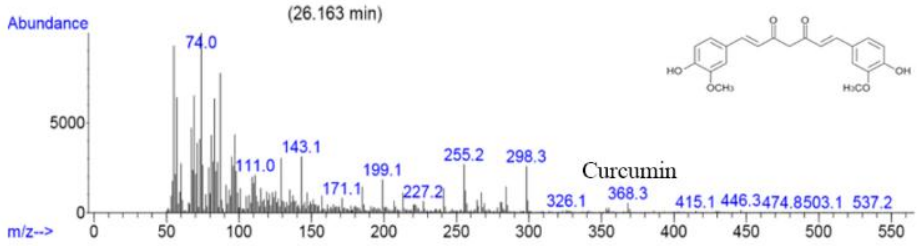
شکل شماره ۲. طیف. UV. A نمونه استاندارد کورکومین. B. عصاره سوکسله زردچوبه



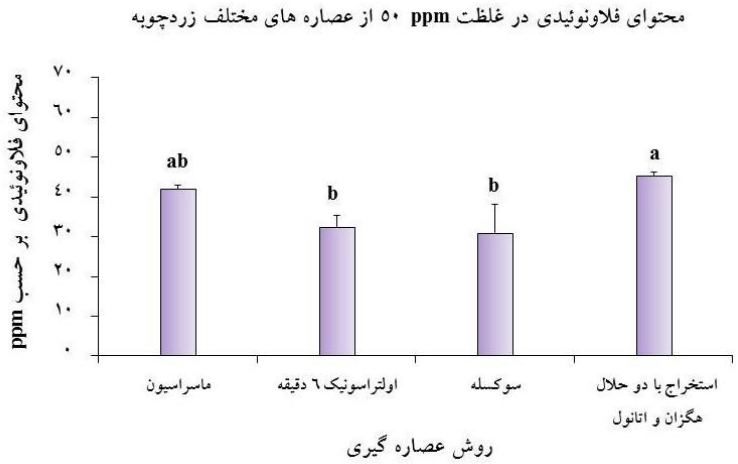
شکل شماره ۳. کروماتوگرام به دست آمده از آنالیز GC. A. نمونه استاندارد کورکومین و B. عصاره سوکسله زردچوبه. از آن جا که نمونه اصلی حاوی مقادیر بیشتر از جزء کورکومین بوده شارپ ترین پیک به عنوان پیک کورکومین در نظر گرفته شده است که نشان داده شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

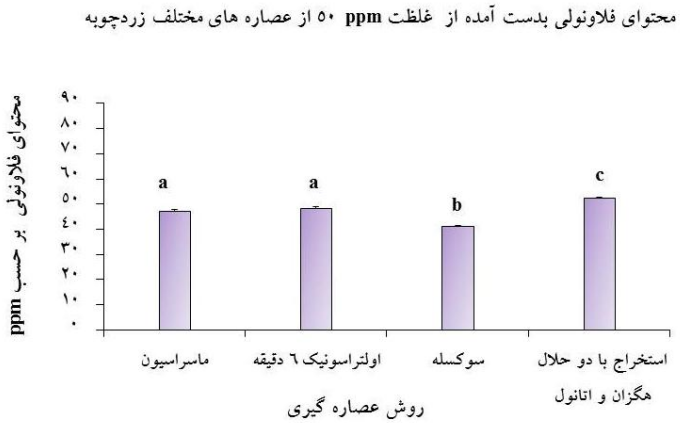
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]



شکل شماره ٤. طیف جرمی کورکومین حاصل از عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه.
محور عمودی فراوانی نسبی و محور افقی نسبت بار به جرم را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱. محتوای فلاونوئیدی در غلظت $\mu g\ mL^{-1}$ ۵۰ از عصاره های مختلف زردچوبه. مقادیر ذکر شده میانگین تکرار±خطای استاندارد می باشد. حروف نامشابه در بالای ستون ها معرف عدم تفاوت معنی دار سطح $P<0.05$ بین میانگین های محتوای فلاونوئیدی هر نمونه در روش های مختلف عصاره گیری می باشد.



نمودار شماره ۲. محتوای فلانولی در غلظت $\mu g\ mL^{-1}$ ۵۰ از عصاره های مختلف زردچوبه. مقادیر ذکر شده میانگین تکرار±خطای استاندارد می باشد. حروف نامشابه در بالای ستون ها معرف تفاوت معنی دار بین میانگین های محتوای فلاونولی هر نمونه در روش های مختلف عصاره گیری می باشد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]
[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه به بررسی فیتوشیمیایی عصاره سوکسله اتانولی زردچوبه با تاکید بر شناسایی کورکومینوئیدها با روش های کمی و کیفی مختلف پرداخته است. نتایج آزمون های فیتوشیمیایی حضور ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و گلیکوزیدی و عدم حضور ترکیبات تانني و ساپونینی در عصاره سوکسله اتانولی این گیاه را نشان می دهد. یافته های IR، UV، GC و GC/Mass بیانگر وجود کورکومینوئیدها در عصاره زردچوبه به روش سوکسله می باشد. اهمیت این یافته آن است که روش سوکسله با بالاترین راندمان عصاره گیری(۱۰)، نسبت به سایر روش های عصاره گیری، با وجود شرایط ویژه عصاره گیری از جمله دمای بالا و مدت زمان نسبتاً کوتاه، حاوی متابولیت های ثانویه قابل شناسایی از جمله ترکیبات کورکومینوئیدی می باشد که روش های مختلف شناسایی بیانگر حفظ ساختار این ترکیب با اهمیت می باشد. استفاده از روش های تشخیص دقیق و حساس از جمله GC و GC/Mass در این مطالعه ضروری بود که موجب حصول اطمینان از وجود کورکومین در عصاره سوکسله زردچوبه و امکان استفاده از این روش عصاره گیری برای اهداف درمانی و کاربرد آن در سنتز داروهای گیاهی می باشد.

ترکیبات فنلی از جمله متابولیت های ثانویه گیاهان هستند که از هسته های آروماتیک و یک یا چند گروه OH ساخته شده اند و به فنل های ساده، اسیدهای فنلی، کومارین ها، فلاونوئیدها، استیلبن ها، پروسیانیدین ها، لیگنان ها و لیگنین ها تقسیم می شوند(۱۹). Noori و همکاران در سال ۲۰۱۶ توانستند محتوای فنلی عصاره های مختلف گیاه زردچوبه را با استفاده از استاندارد اسید گالیک و معرف فولین اندازه گیری کنند که از بین سه عصاره مورد بررسی، عصاره ماسراسیون، بیشترین محتوای فنلی را دارا بود(۱۰).

در این پروژه نیز بررسی محتوای فلاونوئیدی با استفاده از استاندارد کوئرستین نشان داد که بیشترین مقدار این ترکیبات در عصاره به دست آمده از دو حلال هگزان و اتانول است. هم چنین بررسی محتوای فلاونولی با استفاده از این استاندارد هم چنین نشان داد که بیشترین محتوای فلاونولی نیز در عصاره استخراجی با استفاده از دو حلال هگزان و اتانول می‌باشد.

طبق بررسی Deb و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی عصاره هیدروالکلی زردچوبه به روش سوکسله، در این نوع عصاره ترکیبات آلکالوئیدی و گلیکوزیدی یافت نشد این در حالی است که ترکیبات تانني و فلاونوییدی به آزمون های مربوطه پاسخ مثبت دادند(۱۴). هم چنین بررسی Sawant و همکارش در سال ۲۰۱۳ نشان داد که عصاره اتانولی مربوطه حاوی ترکیبات آلکالوئیدی، ساپونینی تانني و فلاونوئیدی می باشد(۲۰). این در حالی است که نتایج حاصله از آزمون های فیتوشیمیایی در این گزارش، حضور ترکیبات آلکالوئیدی، فلاونوئیدی و گلیکوزیدی و عدم حضور ترکیبات تانني و ساپونینی در عصاره سوکسله اتانولی گیاه(Curcuma longa) را تایید نمود که تا حدودی با نتایج به دست آمده از بررسی های Deb و همکاران و Sawant و همکارش در سال ۲۰۱۳ هم خوانی دارد و عدم هم خوانی برخی از نتایج می تواند به نوع روش عصاره گیری و نوع حلال استفاده شده مربوط گردد.

Sahu و همکارش در سال ۲۰۱۳ محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره سوکسله متانولی را بر روی سه گونه متفاوت curcuma بررسی نمودند. طبق بررسی آن ها بیشترین محتوای فنلی و فلاونوئیدی در گونه curcuma longa دیده شد و به دلیل بالا بودن این مقادیر در این گونه، می توان گفت که گونه curcuma longa خواص آنتی اکسیدانی بالاتری دارد(۲۱).

Nabati و همکاران در سال ۲۰۱۴ وجود کورکومین در عصاره سوکسله زردچوبه را با استفاده از روش های طیف سنجی نظیر HPLC، UV-Vis و Mass نشان دادند. آنالیز HPLC زمان بازداری کورکومینوئیدها را در محدوده زمانی ۱۳ تا ۱۸ دقیقه نشان داد(۲۲) این در حالی است که زمان بازداری برای کورکومینوئیدها در گزارش داده شده توسط Noori و همکاران در سال ۲۰۱۶، در محدوده زمانی ۶ تا ۸ دقیقه می باشد که علت آن می تواند به شرایط انتخابی برای دستگاه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

مربوط گردد(۱۰). آنالیز UV-Vis انجام شده توسط Nabati و همکاران در سال ۲۰۱۴ ، جذب بیشینه کورکومین را در طول موج ۴۲۳ نانومتر نشان داد. هم چنین طیف Mass گزارش شده توسط تیم تحقیقاتی آنان، پیک یون مولکولی مربوط به کورکومین را نشان داد(۲۲) که نتایج آنان با نتایج گزارش داده شده از این پژوهش هم خوانی دارد.

Bahrami و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی بررسی اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش و مرئی در طول موج های ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر بر روی عصاره هیدروالکلی، نشان دادند که طیف جذبی و طیف IR نمونه استاندارد کورکومین و عصاره استخراج شده زردچوبه حدوداً مشابه می باشد(۲۳).

نتایج حاصله از بررسی طیف IR، UV، GC و GC/Mass در این گزارش نیز، وجود کورکومین که ماده موثره زردچوبه می باشد را در عصاره سوکسله اتانولی این گیاه تایید نمود. آنالیز IR گروه های عاملی مربوط به کورکومینوئیدها، آنالیز UV محدوده جذبی و جذب بیشینه کورکومین، آنالیز GC تطابق پیک های کورکومین نمونه استاندارد و عصاره سوکسله زردچوبه و آنالیز GC/Mass حضور پیک یون مولکولی کورکومین را تایید نمود.

با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت های گیاهی و افزایش تقاضا، محققین به دنبال روش هایی به منظور استخراج هر چه بیشتر این ترکیبات هستند. آنالیزهای دستگاهی انجام شده در این بررسی، وجود کورکومینوئیدها را در عصاره اتانولی سوکسله تایید نمود و استفاده از این عصاره را برای کاربردهای داروسازی کورکومین پیشنهاد می کند. هم چنین عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول زردچوبه به دلیل بالا بودن مقادیر ترکیبات فلاونوئیدی و فلاونولی که نقش آنتی اکسیدانی دارند، پتانسیل بالائی در توسعه داروهای مدرن دارد. هم چنین هزینه پایین، امنیت فارماکولوژیکی و کارآمدی، کورکومین را به فرآورده ای امیدبخش برای پیشگیری و درمان بیماری های مختلف تبدیل کرده است. البته برای دستیابی به تمام فواید درمانی کورکومین، مطالعات بیشتری نیاز است.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه های این پژوهش(پژوهانه-های شماره ۳۱۵۷۹ /۹۴/۳/۰۲ و شماره ۳۱۵۸۰ /۹۴/۳/۲) در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می نمایند.

کد اخلاق:

References

1. Omid Beigi R. Production and processing of medicinal plants.7th ed. Astan Quds Razavi Publication. 2013; P. 61.
2. Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. J Uni Chem Technol Met2005; 40: 255-60.
3. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79: 727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
4. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 2002; 13: 572-84. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
5. Haydarimajd M, Mortazavi SA, Asili J, Bolorian S, Armin M, Abdolshahi A. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Flomidoschema parviflora. J Herbal Drug 2012; 3:7-13.
6. Wakte PS, Sachin BS, Patil AA, Mohato DM, Band TH, Shinde DB. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. Sep Pur Technol 2011; 79: 50-5. doi: 10.1016/j.seppur.2011.03.010.
7. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. Molecules2010; 15: 7792-814. doi: 10.3390/molecules15117792.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

8. Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK, et al. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo US cross national dementia study. Arch Neurol 2000; 57: 824-30.

9. Samsamshariat SH. Extraction identification and specification of active ingredients from medicinal Plants. 1th ed. Esfahan Mani Publication. 2013;P.123-9.

10. Noori S, Kiasat AR, Kolahi M, Mirzajani R, Seyyednezhad SM. Survey of phytochemical antioxidant and optimization of extraction methods for the best method determination of curcumin extraction from ethanol extracts of Curcoma longa L.. EJMP 2016; 15: 1-11.

11. Zetterstrom S. Isolation and synthesis of curcumin. Bachelors thesis Link Uni Dept Phys Chem Biol. 2012.

12. Rouhani S, Alizadeh N, Salimi S, Hajighasemi T. Ultrasonic assisted extraction of natural pigments from rhizomes of Curcuma Longa L. Prog Color Coat2009; 2: 103-13.

13. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from Curcuma longa Zingiberaceae. J Ethnopharmacol 1995; 49: 163-9. doi: 10.1016/0378-8741(95)01320-2.

14. Deb N, Majumdar P, Ghosh AK. Pharmacognostic and phytochemical evaluation of the rhizomes of Curcuma longa Linn. J Pharm Sci Tech 2013; 2: 81-6.

15. Zohra SF, Meriem B, Samira S, Alsayadimuneer M. Phytochemical screening and identification of some compounds from mallow. J Nat Prod Plant Res 2012; 2: 512-6.

16. Kardani F, Daneshfar A, Sahrai R. Determination of β sitosterol and cholesterol in oils after reverse micelles with Triton X100 coupled with ultrasound assisted back extraction by a water chloroform binary system prior to gas chromatography with flame ionization detection. Anal Chim Acta2011; 701: 232-7. doi: 10.1016/j.aca.2011.05.047.

17. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem1999; 64: 555-9. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.

18. Kumaran A, Karunakaran RJ. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. Food Sci Technol 2007; 40: 344-52. doi: 10.1016/j.lwt.2005.09.011.

19. Mokari F, Gholamali Pouralamdari E, Bayatkoohsar J. Phytochemical analysis of plant organs of Rheum ribes in Flowering stage. J Plant Environ Physiol2016; 42: 25-36.

20. Sawant RS, Godghate AG. Qualitative phytochemical screening of rhizomes of Curcuma longa linn. IJEST 2013; 2: 634-41.

21. Sahu R, Saxena J. Screening of total phenolic and flavonoid content in conventional and non-conventional species of Curcuma. J Pharmacogn Phytochem2013; 2: 176-09.

22. Nabati M, Mahkam M, Heidari H. Isolation and characterization of Curcumin from powdered rhizomes of turmeric plant marketed in Maragheh city of Iran with soxhlet technique. Iran Chem Commun2014; 2: 236-43.

23. Bahrami M, Afshari Z, Ahmadi F, Mohiti MJ, Jalalikhanabadi BA, Moradi A. [Evaluation of phenolic content of turmeric hydroalcoholic extract in iran by singleton method]. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2013; 21: 281-90. (Persian)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]

Phytochemical Study and Recognition of Curcuminoids of Turmeric (Curcuma longa L.) Extract and Comparison of the Flavonoid and Flavanol Content Utilizing Different Extraction Methods

Noori S[1], Kiasat A[1], Kolahi M[2], Mirzajani R[1], Seyyednejad M[2]

(Received: July 8, 2017 Accepted: December 3, 2017)

Abstract

Introduction: Curcuma longa L. (turmeric) belongs to the Zingiberaceae family. The aim of this study was to evaluate the phytochemicals present in turmeric. The method of extraction has an effect on the percentage and type of chemical compounds extracted. Instrumental analysis was used to determine the flavonoid and flavanol content of turmeric utilizing different extraction methods.

Materials & Methods: Phytochemical tests were performed on an ethanolic Soxhlet extract to determine the secondary metabolites present. Different methods of instrumental analysis were used to verify the presence of curcuminoids. Flavonoid and flavanol content was evaluated using different extraction methods. They included maceration, ultrasonic, and Soxhlet extraction. Quercetin was utilized as standard.

Findings: Phytochemical studies confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, and glycosides in turmeric ethanolic extracts. Tannins and saponins were however absent. IR, UV, GC, and GC/MS indicate the presence of curcuminoids in turmeric extract prepared by Soxhlet extraction. Statistical analysis indicated that the highest flavonoid and flavanol content was from hexane and ethanolic extracts.

Discussion & Conclusions: Despite the requirement of high temperature and the use of a hot solvent in Soxhlet extraction, the curcuminoids structure was retained. This method of extraction may be suitable for extraction of curcumin from the turmeric plant. Another suitable extraction method for flavonoid and flavanol compounds is the use of both ethanol and hexane as solvents.

Keywords: Curcuma longa L, Extraction, Curcuminoid, Flavonoid, Flavanol

1.Dept of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2.Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
** Corresponding author Email:m.kolahi@scu.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-05-16]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.6.86]